



Beschreibung

EP 0 943 685 A2

(19)

EUROPAISCHE PATENTANMELDUNG

(11) EP 0 943 685 A2

(12) (43) Veröffentlichungstag:
22.09.1998 Patentblatt 1999/38

(21) Anmeldenummer: 99 01164.4

(22) Anmeldetag: 22.01.1999

(34) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU NL MC NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 11.02.1998 DE 1980 5351

(71) Anmelder:
BASF AKTIENGESELLSCHAFT
67056 Ludwigshafen (DE)

(72) Erfinder:
• Kröger, Burkhard, Dr.
• Oberbach, Bernd, Dr.
67051 Ludwigshafen (DE)

(51) Int. Cl. 6: C12N 15/12, C07K 14/705,
C07K 16/28, A61K 48/00,
C12Q 1/68, G01N 33/576,
G01N 33/68, C12N 5/10

(5) [0001] Die Lipoproteine dieser Rezeptorfamilie sind mit biologen Aminen (z.B. Adrenalin, Serotonin, Histamin), Peptidhormonen (z.B. Angiotensin, Endothelin, Bradykinin), Neurotransmittern (z.B. NPY, Substanz P, Opiode) und Proteinen (z.B. Chymotrypsin, Thrombin) sehr weitafliegend. Alle diese Messenger sind durch Interaktion mit G-Proteinen an der Signalübertragung in das Innere der Zelle beteiligt. Als Effektoren sind bekannt: Adenylatzyklase, Phospholipase C, Phosphoinositidezyklase.

[0002] Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren werden in drei Unterfamilien unterteilt: die Rhodopsin-Unterfamilie, Calcitonin-Unterfamilie und Glutamat/mabutrope-Unterfamilie.

[0003] Die Rezeptoren sind charakterisiert durch eine Aminosäuresequenz mit 7 ausgesparten hydrophoben Bereichen. Diese stellen höchstwahrscheinlich membranständige Domänen dar und geben der Familie ihren zweiten Namen: 7-Transmembran-Domänen Rezeptoren.

[0004] Die Lipoproteine dieser Rezeptorfamilie sind mit biologen Aminen (z.B. Adrenalin, Serotonin, Histamin), Peptidhormonen (z.B. Angiotensin, Endothelin, Bradykinin), Neurotransmittern (z.B. NPY, Substanz P, Opiode) und Proteinen (z.B. Chymotrypsin, Thrombin) sehr weitafliegend. Alle diese Messenger sind durch Interaktion mit G-Proteinen an der Signalübertragung in das Innere der Zelle beteiligt. Als Effektoren sind bekannt: Adenylatzyklase, Phospholipase C, Phosphoinositidezyklase.

[0005] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Proteine mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoraktivität, die ausgedehnt von der in SEQ ID NO.2 dargestellten Aminosäuresequenz durch gezielte Veränderungen herstellbar sind. Beispielsweise können bestimmte Aminosäuren durch solche mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften (Aminosäuresequenz, Basizität) ersetzt werden. Es können aber auch ein oder mehrere Aminosäuren lösungsgünstig oder entfernt werden, oder mehrere dieser Maßnahmen miteinander kombiniert werden. Die solchenmaßen Openbarer der SEQ ID NO.2 veränderten Proteine besitzen weniger als 50 %, bevorzugt weniger als 15 % Homologie zu SEQ ID NO: 2, berichtet nach dem Algorithmus von Pearson und Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 2444-2448.

[0006] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Nukleinsäuresequenzen, die für die o.g. Proteine codieren, insbesondere solche mit der in SEQ ID NO.1 dargestellten Primärstruktur.

[0007] Die wesentliche biologische Eigenschaft ist in der Aktivität als Rezeptor, insbesondere als G-Protein-gekoppelte Rezeptor zu sehen.

[0008] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Proteine mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoraktivität, die ausgedehnt von der in SEQ ID NO.2 dargestellten Aminosäuresequenz durch gezielte Veränderungen herstellbar sind. Beispielsweise können bestimmte Aminosäuren durch solche mit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften (Aminosäuresequenz, Basizität) ersetzt werden. Es können aber auch ein oder mehrere Aminosäuren lösungsgünstig oder entfernt werden, oder mehrere dieser Maßnahmen miteinander kombiniert werden. Die solchenmaßen Openbarer der SEQ ID NO.2 veränderten Proteine besitzen weniger als 50 %, bevorzugt weniger als 15 % Homologie zu SEQ ID NO: 2, berichtet nach dem Algorithmus von Pearson und Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 2444-2448.

[0009] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Nukleinsäuresequenzen, die für die o.g. Proteine codieren, insbesondere solche mit der in SEQ ID NO.1 dargestellten Primärstruktur.

[0010] Die vorliegende cDNA kann durch den Fachmann gängige Klonierungs- und Transfektionsmethoden in verschiedenen Expressionssystemen zur Expression gebracht werden. Dieses sind beispielsweise pro- oder eukaryotische Vektorssysteme, wie SV40, CMV, Bakteriavirus, Adenovirus, Plasmide, Phagen, Phage, Plasmide, Phagen, Phage.

[0011] Dazu wird die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz dichterweise mit gentermischen Regulationselementen wie Transkriptions- und Translationssignalen funktionell verknüpft. Mit den solchenmaßen hergestellten rekombinanten Nukleinsäurekonstruktionen werden anschließend Wirtszellen transformiert.

[0012] Eine bevorzugte Ausführungform ist die Verknüpfung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz mit einem Promotor, wobei der Promotor 5' upstream zu liegen kommt. Weitere Regulationssignale wie Terminator, Polyadenyllierungssignale, Enhancer können in dem Nukleinsäurekonstrukt Anwendung finden.

[0013] Als Wirtszellen sind Bakterien wie Escherichia coli, eukaryotische Mikroorganismen wie Saccharomyces cerevisiae, höhere eukaryotische Zellen aus Tieren oder Pflanzen, beispielsweise Sf9 oder CHO-Zellen, geeignet.

[0014] Gewünschtes kann das Genprodukt auch in transgenen Organismen wie transgenen Tieren, z.B. Mäusen, Schafen oder transgenen Pflanzen zur Expression gebracht werden.

[0015] Bei der vorliegenden Erfindung handelt es sich um eine neue Mitglied der G-Protein-gekoppelten Rezeptorfamilie kodiert. Sequenzvergleiche zeigen Verwandtschaft mit Endothelinrezeptoren und Endothelinrezeptor-ähnlichen Sequenzen.

[0016] Die vorliegende Nukleinsäuresequenz wurde ursprünglich in mehreren cDNA-Bibliotheken aus humanem Gehirn und Rückenmark identifiziert. Die Analyse der Verteilung der zugehörigen mRNA in 50 verschiedenen menschlichen Geweben ergab fast ausschließliche Expression im Gehirn.

[0017] Das durch die vorliegende cDNA kodierte Polypeptid läßt sich zweifelsfrei als G-Protein-gekoppelte Rezeptor identifizieren. Die 7 Transmembran-Domänen dieser Proteinfamilie lassen sich leicht im Hydrophophilitäts-Plot (Kyte, J. and R.F. Doolittle, 1982, J. Mol. Biol. 157, 105-132 (1982)) finden. Die größte Verwandtschaft auf Aminosäureebene findet sich mit 52 % Identität zu einem putativen Endothelinrezeptor Typ Bähnlichen Protein humanen Ursprungs (Genbank Accession Nummer U87460, (Fasta-Programm, Pearson und Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 85, 2444-2448).

[0018] In besonderen Fällen kann das Genprodukt auch in transgenen Tieren, z.B. Mäusen, Schafen oder transgenen

Pflanzen zur Expression gebracht werden. Ebenso ist es möglich, zellfreie Transitionssysteme mit der entsprechenden RNA zu programmieren.

[0019] Darüberhinaus kann das Genprodukt auch in Form therapeutisch oder diagnostisch geeigneter Fragmente exprimiert werden. Zur Isolation des rekombinanten Proteins können Vektorsysteme oder Oligoribonukleotide verwendet werden, die die cDNA um bestimmte Nukleotidsequenzen verlängern und damit für veränderte Polypeptide kodieren, die einer einfacheren Reinigung dienen. Als solche "Tags" sind in der Literatur z.B. Hexa-Histidin-Anker bekannt oder Epitope, die als Antigene verschiedannter Antikörper erkannt werden können (beschrieben zum Beispiel in Harlow, E. and Lane, D. (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor (N.Y.) Press).

[0020] Ausgehend von der Peptidsequenz können synthetische Peptide generiert werden, die als Antigene für die Produktion von Antikörpern eingesetzt werden. Es ist auch möglich, das Polypeptid oder Bruchstücke davon zur Generierung von Antikörpern einzusetzen.

[0021] Die Herstellung von Antikörpern ist eine dem Fachmann gewöhnige Tätigkeit. Mit Antikörpern sind sowohl polyclonale monoklonale, humane oder rumänische Antikörper oder Fragmente davon, single chain Antikörper oder auch synthetische Antikörper gemeint.

[0022] Die vorliegende cDNA bietet außerdem die Voraussetzung, die genomische Sequenz dieses neuen G-Protein-gekoppelten Rezeptors zu klonieren. Darunter fällt auch die daszugehörige regulatorische oder Promotorsequenz, die beispielweise durch Sequenzierung des 5' upstream Bereiches der voriglegenden cDNA zugänglich wird. Die Sequenzinformation der cDNA ist auch die Grundlage für die Herstellung von antisense Molekülen oder Ribozymen.

[0023] Eine weitere Möglichkeit des Einsatzes der Nukleotidsequenz oder Teilen davon ist die Erzeugung transgener Tiere. Transgene Überexpression oder genetischer Knockout der Sequenzinformation in geeigneten Tiermodellen kann wertvolle weitere Informationen über die Patho-/Physiologie des neuen G-Protein-gekoppelten Rezeptors.

[0024] In Situationen, in denen ein Mangel an dem beschriebenen Rezeptor (Protein gemäß Anspruch 1) herrscht, können mehrere Methoden zur Substitution eingesetzt werden. Zum einen kann das Protein, natürlich oder rekombinant direkt, oder durch geeignete Maßnahmen in Form seiner kodierenden Nukleinsäure (DNA oder RNA) appliziert werden. Dazu kommen sowohl virale, als auch nichtvirale Vehikel zum Einsatz.

[0025] Ein weiterer Weg bietet sich durch die Stimulation des endogenen, körpereigenen Genes durch geeignete Mittel. Auch der turn-on- oder die half-dominanzartige Wirkung durch Rezeptorkinasen können blockiert werden. Schließlich können Antagonisten dieses Rezeptors zum Einsatz gelangen.

[0026] In Situationen, in denen überschüssiger Rezeptor vorliegt, können verschiedene Inhibitoren eingesetzt werden. Diese Inhibition kann sowohl durch antisense Moleküle oder Ribozyme, oder Antikörper und Oligonukleotide, als auch durch niedermolekulare Verbindungen erreicht werden. Darüberhinaus kann der Rezeptor auch durch Antagonisten blockiert werden.

[0027] Weiterhin können die cDNA, die genomische DNA, der Promotor, als auch das Polypeptid, sowie Teilstücke davon in rekombinanter oder nichtrekombinanter Form zur Ausarbeitung eines Testsystems verwendet werden. Dieses Testsystem ist geeignet, die Aktivität des Protorors oder Liganden in Anwesenheit einer Testsubstanz zu messen. Bevorzugt handelt es sich dabei um einfache Melittinoden (colorimetrischer, lumineszentischer, fluorimetrischer, immunologischer oder radioaktiver Art), die die schnelle Meßbarkeit einer Vielzahl von Testsubstanz erlauben. Die Bezug zum neuen Rezeptor zu beschreiben.

[0028] Die Bestimmung von Menge, Aktivität und Verteilung des Rezeptors oder seiner zugrundeliegenden mRNA im menschlichen Körper kann zur Diagnose, Prädisposition und zum Monitoring bei bestimmten Erkrankungen dienen. Desgleichen kann die Sequenz der cDNA sowie die genetischen Varianten zu Aussagen über genetische Ursachen und Prädisposition bestimmter Erkrankungen herangezogen werden. Dazu können sowohl DNA/RNA-Proteine, sowie unnatürliche DNA/RNA-Proteine, als auch Antikörper verschiedenster Art benutzt werden. Dabei dient die beschriebene Nukleotidsequenz oder Teile davon in Form geeigneter Proben zur Aufdeckung von Punktmutationen oder Deletionsvarianten.

[0029] Weiterhin kann das beschriebene Protein benutzt werden, um seine natürlichen Liganden zu bestimmen und zu isolieren. So kann der Rezeptor rekombinant in Zellkultur exprimiert und sein Aktivierungszustand z.B. anhand des cAMP-Spiegels abgeleitet werden. Der cAMP-Spiegel läßt sich immunologisch oder mittels Reportertechnologie ermitteln. Damit ergibt sich auch ein diagnostisches Verfahren den Spiegel des Rezeptorliganden in Körperfüssigkeiten oder Geweben zu bestimmen.

[0030] Die erfundungsgemäße Nukleotidsequenz und das von ihr kodierte Protein können zur Entwicklung von Reagenzien, Agonisten und Antagonisten zur Diagnose und Therapie von chronischen und akuten Erkrankungen des zentralen und peripheren Nervensystems, wie Alzheimer's, Depression, Demenz, Migräneattacken, Hirntumore, Schmerz, Schizophrenie, Angstzustände, Schlafapnoe, Schlaganfall, Schafssturz, Aphoben, Husten, Psychosen, Parkinsons, Epilepsie, ALS, Drogenabhängigkeit, Lähmungen, sowie zur Cerebroprotection und bei Erkrankungen mit nervöser Komponente, wie Obesity, Autonie, Ruhigstellung eingesetzt werden.

[0031] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis einer Nukleotidsequenz.

insäure nach Anspruch 3 in einer biologischen Probe, das folgende Schritte umfaßt:

- a) Inkubation einer biologischen Probe mit einer bekannten Menge an Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 oder einer bekannten Menge an Oligonukleotiden, die als Primer für eine Amplifikation der Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 geeignet sind,
- b) Nachweis der Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 durch spezifische Hybridisierung oder PCR-Amplifikation
- c) Vergleich der Menge an hybridisierender Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 oder an durch PCR Amplifikation gewonnener Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 mit einem Standard.

- 5 10 15
- d) Inkubation einer biologischen Probe mit einem Antikörper, der spezifisch gegen das Protein gemäß Anspruch 1 gerichtet ist,
- e) Nachweis des Antikörper/Antigenkomplexes,
- f) Vergleich der Mengen des Antikörper/Antigenkomplexes mit einem Standard.

- 10 15 20
- g) Standard können biologische Proben wie Gewebestücke, Serum oder Blut dienen, die von gesunden Probanden entnommen wurden.

- 25
- h) Klonierung der Rezeptor cDNA

- 30 35
- i) Bei der Sequenzanalyse von cDNA-Klonen einer cDNA-Bibliothek aus menschlichem Gehirn wurde zunächst eine Teilsequenz identifiziert. Die Sequenz dieses Teilkrons umfaßt den Bereich zwischen Nukleotidposition 352 und 2411 in SEQ ID NO:1.

- j) Aus einer cDNA-Bibliothek aus menschlichem Gehirn (Human Brain 5'Stretch Plus cDNA Library, # HL5018I, Fa. Clontech, Jahr 1997) wurde die Gesamtsequenz SEQ ID NO:1 mittels geschachtelter Polymerase Chain Reaktion amplifiziert. Dazu kamen folgende Oligonukleotidprimere zu Anwendung:
- 35 40
- PCR1: mit SEQ ID NO: 3 und SEQ ID NO: 4;
- PCR2: mit SEQ ID NO: 3 und SEQ ID NO: 5.

Beispiel 2

Expression des neuen Rezeptors in menschlichen Geweben

- k) Die Expression des neuen Rezeptors wurde in 50 verschiedenen menschlichen Geweben mittels RNA-Dot-blot-Analyse untersucht. Ein Blot der Firma Clontech (#7770-1) wurde dazu mit einer Rezeptor-Probe hybridisiert. Die Probe wurde durch *in vitro* Transkription der entsprechenden cDNA in Anwesenheit Digoxigenin-markierter Nukleotide hergestellt. Nach stringentem Waschen wurde das Transcript hauptsächlich in Gehirngewebe nachgewiesen.

50

55

EP 0 943 685 A2

EP 0 943 685 A1

SEQUENCE LISTING

SEQUENCE LISTING

<110> BASF Aktiengesellschaft.

5

tcc aag agg ggc acc ggg gat ggg gag gac aag ggc agt gtc cag cag tat
 ser lys arg gly thr glu asp glu glu ala lys gly val glu gin tyr
 45 50 55

<120> Neuer G-Protein gekoppelter Rezeptor aus menschlichem
 Hirn

10

gtg cct gag gag tgg ggg gag tac ccc cgg ccc att cac cct gct ggc
 Val Pro Glu Glu Trp Ala Glu Tyr Pro Arg Pro Ile His Pro Ala Gly
 60 65 70 75

<130> OZ 0050/48774

15

ctg cag cca acc aag ccc ttg gtg gcc acc agc cct aac ccc gac aag
 Asp Gly Gly Thr Pro Asp Ser Gly Gin Gin Leu Arg Gly Asn Leu Thr
 Leu Glu Pro Thr Lys Pro Leu Val Ala Thr Ser Pro Asn Pro Asp Lys
 80 85 90 95

<140>

20

999 gca cca cgg cag egg cta cag atc cag sac acc ccc org tar cgg cgg
 Gly Ala Pro Gly Gin Arg Leu Gin Ile Gin Ile Asn Pro Leu Tyr Pro Val
 110 115 120

<141>

25

acc gag agc tcc tac act ggc ttc gcc atc atg ctt ctg gcg ctg gtc
 Thr Glu Ser Ser Tyr Ser Ala Tyr Ala Ile Met Leu Ile Ala Leu Val
 125 130 135

<150> DE 19805151.7

30

gtg ttt gcy gty ggc att gtc ggc sac ctc ctt ctc gtc atc gtc
 Val Phe Ala Val Gly Ile Val Gly Asn Leu Ser Val Met Cys Ile Val.
 140 145 150 155

<151> 1998-02-11

35

tgt cac agc tac tac ctg aag agc ggc tgg eac tcc atc ctt ggc gtc
 Tyr His Ser Tyr Tyr Leu Lys Ser Ala Trp Asn Ser Ile Leu Ala Ser
 160 165 170 175

<160> Patentin Ver. 2.0

40

tgtccctgtt catccaggcc atg cgg tgg cgg ccc ctg gtc gtc tct ctt
 Met Arg Trp Leu Trp Pro Leu Ala Val Ser Ile Phe Asn Glu Ile Val
 1 5 10 15

<170> DE 19805151.7

45

tgtccctgtt gtc ccc atg gag gtc tcc tct ctg gga gtc acc act ttc
 Arg Ala Val Pro Phe Met Glu Val Ser Ser Ile Leu Gly Asp Val Ser Cys
 190 195 200 205

<180> 1998-02-11

50

tgtccctgtt gtc ccc atg gag gtc tcc tct ctg gga gtc acc act ttc
 Ser Leu Cys Ala Ile Gly Ile Asp Arg Phe His Val Ala Thr Ser Thr
 220 225 230 235

<190> 1998-02-11

55

tgtccctgtt gtc ccc atg gag gtc tcc tct ctg gga gtc acc act ttc
 Ser Leu Cys Ala Ile Gly Ile Asp Arg Phe His Val Ala Thr Ser Thr
 270 275 280 285

<200> 1998-02-11

60

tgtccctgtt gtc ccc atg gag gtc tcc tct ctg gga gtc acc act ttc
 Ser Leu Cys Ala Ile Gly Ile Asp Arg Phe His Val Ala Thr Ser Thr
 330 335 340 345

<210> 1

65

tgtccctgtt gtc ccc atg gag gtc tcc tct ctg gga gtc acc act ttc
 Ser Leu Cys Ala Ile Gly Ile Asp Arg Phe His Val Ala Thr Ser Thr
 390 395 400 405

<220> 1

70

tgtccctgtt gtc ccc atg gag gtc tcc tct ctg gga gtc acc act ttc
 Ser Leu Cys Ala Ile Gly Ile Asp Arg Phe His Val Ala Thr Ser Thr
 450 455 460 465

<230> 1

75

tgtccctgtt gtc ccc atg gag gtc tcc tct ctg gga gtc acc act ttc
 Ser Leu Cys Ala Ile Gly Ile Asp Arg Phe His Val Ala Thr Ser Thr
 510 515 520 525

<240> 1

80

tgtccctgtt gtc ccc atg gag gtc tcc tct ctg gga gtc acc act ttc
 Ser Leu Cys Ala Ile Gly Ile Asp Arg Phe His Val Ala Thr Ser Thr
 570 575 580 585

<250> 1

85

tgtccctgtt gtc ccc atg gag gtc tcc tct ctg gga gtc acc act ttc
 Ser Leu Cys Ala Ile Gly Ile Asp Arg Phe His Val Ala Thr Ser Thr
 630 635 640 645

<260> 1

90

tgtccctgtt gtc ccc atg gag gtc tcc tct ctg gga gtc acc act ttc
 Ser Leu Cys Ala Ile Gly Ile Asp Arg Phe His Val Ala Thr Ser Thr
 690 695 700 705

<270> 1

95

tgtccctgtt gtc ccc atg gag gtc tcc tct ctg gga gtc acc act ttc
 Ser Leu Cys Ala Ile Gly Ile Asp Arg Phe His Val Ala Thr Ser Thr
 750 755 760 765

<280> 1

100

tgtccctgtt gtc ccc atg gag gtc tcc tct ctg gga gtc acc act ttc
 Ser Leu Cys Ala Ile Gly Ile Asp Arg Phe His Val Ala Thr Ser Thr
 810 815 820 825

<290> 1

105

tgtccctgtt gtc ccc atg gag gtc tcc tct ctg gga gtc acc act ttc
 Ser Leu Cys Ala Ile Gly Ile Asp Arg Phe His Val Ala Thr Ser Thr
 870 875 880 885

<300> 1

110

tgtccctgtt gtc ccc atg gag gtc tcc tct ctg gga gtc acc act ttc
 Ser Leu Cys Ala Ile Gly Ile Asp Arg Phe His Val Ala Thr Ser Thr
 930 935 940 945

<310> 1

115

tgtccctgtt gtc ccc atg gag gtc tcc tct ctg gga gtc acc act ttc
 Ser Leu Cys Ala Ile Gly Ile Asp Arg Phe His Val Ala Thr Ser Thr
 990 995 1000 1005

<320> 1

120

tgtccctgtt gtc ccc atg gag gtc tcc tct ctg gga gtc acc act ttc
 Ser Leu Cys Ala Ile Gly Ile Asp Arg Phe His Val Ala Thr Ser Thr
 1060 1065 1070 1075

EP 0943 685 A2

Leu Pro Lys Val Arg Pro Ile Glu Arg Cys Gln Ser Ile Leu Ala Lys
 240 245 250
 ttg gct gtc atc tgg ggc tcc atc acg ctc gct gtc gat gtc ctc
 Leu Ala Val Ile Trp Val Gly Ser Met Thr Leu Ala Val Pro Glu Leu
 255 260 265
 ctg ctg tgg ctg gca cag gag ctc gcc acc atg ggc acc ctg
 Leu Leu Trp Gln Leu Ala Gln Glu Pro Thr Met Gly Thr Leu
 270 275 280
 gac tca tgc arc arg aaa ccc tca gcc agc ctc gcc gag ctc ctg tat
 Asp Ser Cys Ile Met Lys Pro Ser Leu Pro Glu Ser Leu Tyr
 285 290 295
 tca ctg gtg atg acc tac ceg aac gec cgc atg tgg tac ctt gtc
 Ser Leu Val Met Thr Tyr Gln Asn Ala Arg Met Trp Tyr Phe Gly
 300 305 310 315
 tgc tac ttc tgc ccc atc ctc tcc aca gtc acc tgc cag ctg gtg
 Cys Tyr Phe Cys Leu Pro Ile Leu Phe Thr Val Thr Cys Gln Leu Val
 320 325 330
 aca tgg gtg cta ggc ccc aag tca gag tgc agg tgc agg gcc
 Thr Trp Arg Val Arg Gly Pro Glu Arg Lys Ser Gln Cys Arg Ala
 335 340 345
 agc aag cac gag cag tgt gag agc cag ctc aac agc acc gtc gtc ggc
 Ser Lys His Glu Gln Cys Glu Ser Gln Leu Asn Ser Thr Val Val Gly
 350 355 360
 ctg acc gtc tac gcc ttc tgc acc ctc cca gag aac gtc tgc aac
 Leu Thr Val Val Tyr Ala Phe Cys Thr Leu Pro Glu Asn Val Cys Asn
 365 370 375
 atc gtg gtc tac ctc tcc acc gag ctc acc cgc cag acc ctc gac
 Ile Val Val Ala Tyr Leu Ser Thr Gln Leu Thr Arg Gln Thr Leu Asp
 380 385 390 395
 ctc ctg ggc ctc atc aac cag ttc tcc acc tcc ttc aag ggc gcc atc
 Leu Leu Gly Leu Ile Asn Gln Phe Ser Thr Phe Leu Gln Ala Ile
 400 405 410
 acc cca gtg ctg ctc ctt tgc acc tgc agg ctc gag acc ctc gac
 Thr Pro Val Leu Leu Leu Cys Ile Cys Arg Pro Leu Gln Ala Phe
 415 420 425
 ctg gag tgc tgc tgc tgc tgc tgc tgc gag tgc gag tgc gag tgc gag
 Leu Asp Cys Cys Cys Cys Cys Cys Cys Cys Cys Gln Gln Gln Gln Ala Ser

EP 0943 685 A2

430 435 440
 gat gcc tct gct gtc aat ggg tcc gac aac aag ctc aag acc ggc gtc
 Glu Ala Ser Ala Ala Asn Gly Ser Asp Asn Lys Thr Gln Val
 445 450
 tcc tcc tcc atc tac tcc cac aag ccc aag ggc tca ccc cca ctc ctc
 Ser Ser Ser Ile Tyr Phe His Lys Pro Arg Glu Ser Pro Leu Leu
 460 465 470
 ccc ctg ggc aca cct tgc tgaggccaa tgagggtgg ggaggaggg
 Pro Leu Gly Thr Pro Cys
 480
 agggccgc acccccggcg gtgttgcgtg ttcttcccc ataggctctg ctttgttgc
 1552
 tgcttgcgt tcttaggtat gatgttgtc ctcgtgtcaa gtttggaa tgcaaggc 1612
 ccctcccaac acaggccct tcetgtccct tgggggctt tccaaacctg tcctttccac 1672
 tggggccgg tgatgttctc asgttcttag aactgtccag aatactgtgg tccacgacg 1712
 tggtggccatg aacttgtctc ggcctccctt ggttccaggc ttcttgtctt ctcttgtct 1792
 tggaaaccgtt ccatacttta gtttgtccct tccaggat catcttcca ccaccaacct 1852
 gggggcccat ctgtttttttt gggatggatg ggcctccctt gggccggccc agtgggttc acacacactt 1912
 tctttttttt tttttttt gggatggatg ctgttgtctt tggccaggctt gggatcatt 1972
 tgccctgtgt cagctccctt caaacccggc ctccctggat caagggtttc tcctgtccca 2032
 gtccttcgtt tagccggatg ttcacatgttgc cccggcttat tttttgtttt 2092
 gtggaaagg cggggttcca ccatgttgc cagctgtgg ttcacatctt gacccatgt 2152
 gatccgtctt ctttgtccctt ccaatgtctt gggatccatg gtttgtggc ccacccgg 2212
 ccccgatata ctcttccttg gaccatctt gtcgtgcctt tggatgcctt ctcctactgg 2272
 tgccctttt tttttttt gtttttttgc ttttttttgc ttttttttgc ttttttttgc 2332
 ggttgcctg tcccaaacctt ctgtttttt gtttttttgc ttttttttgc ttttttttgc 2392
 caataacta ggttagactt
 <210> 2
 <211> 481

55

EP 0 943 685 A2

<212> PRT
 <413> Homo sapiens
 5 Met Arg Trp Leu Trp Pro Leu Ala Val Ser Leu Ala Val Ile Leu Ala
 10 Val Gly Leu Ser Arg Val Ser Gly Gly Ala Pro Leu His Leu Gly Arg
 15 Val Gly Ser Met Thr Leu Ala Val Pro Glu Leu Leu Leu Trp Gln Leu
 20 Ala Gln Glu Pro Ala Pro Thr Met Gly Thr Leu Asp Ser Cys Ile Met
 25 His Arg Ala Glu Thr Gln Gln Gln Ser Arg Ser Lys Arg Gly Thr
 30 Glu Asp Glu Glu Ala Lys Gly Val Gln Gln Tyr Val Pro Glu Glu Trp
 35 Ala Glu Tyr Pro Arg Pro Ile His Pro Ala Gly Leu Gln Pro Thr Lys
 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480

Pro Ile Glu Arg Cys Gln Ser Ile Leu Ala Lys Leu Ala Val Ile Trp
 245 250 255
 Val Gly Ser Met Thr Leu Ala Val Pro Glu Leu Leu Leu Trp Gln Leu
 260 265 270
 Ala Gln Glu Pro Ala Pro Thr Met Gly Thr Leu Asp Ser Cys Ile Met
 275 280 285
 Lys Pro Ser Ala Ser Leu Pro Glu Ser Leu Tyr Ser Leu Val Met Thr
 290 295 300
 Tyr Gln Asn Ala Arg Met Trp Trp Tyr Phe Gly Cys Tyr Phe Cys Leu
 305 310 315 320
 Pro Ile Leu Phe Thr Val Thr Cys Gln Leu Val Thr Trp Arg Val Arg
 325 330 335
 Gly Pro Pro Gly Arg Lys Ser Gln Cys Arg Ala Ser Lys His Glu Gln
 340 345 350 355 360 365
 Cys Glu Ser Gln Leu Asn Ser Thr Val Val Gly Leu Thr Val Val Tyr
 370 375 380
 Ala Phe Cys Thr Leu Pro Glu Asn Val Cys Asn Ile Val Val Ala Tyr
 385 390 395 400
 Leu Ser Thr Glu Leu Thr Arg Gln Thr Leu Asp Leu Leu Gly Ile Ile
 405 410 415
 Asn Gln Phe Ser Thr Phe Phe Lys Gly Ala Ile Thr Pro Val Ile Ile
 420 425 430
 Leu Cys Ile Cys Arg Pro Ile Gly Gln Ala Phe Ile Asp Cys Cys Cys
 435 440 445
 Cys Cys Cys Cys Glu Gln Cys Gly Gly Ala Ser Gln Ala Ser Ala Ala
 450 455 460
 Asn Gly Ser Asp Asn Lys Ile Lys Thr Glu Val Ser Ser Ser Ile Tyr
 465 470 475 480
 Phe His Lys Pro Arg Glu Ser Pro Pro Ile Leu Leu Pro Ile Gly Thr Pro
 490 495 500
 Gly Ile Asp Arg Phe His Val Ala Thr Ser Thr Leu Pro Lys Val Arg
 505 510 515
 Cys
 520 525 530 535 540 545 550

EP 0 943 685 A2

9. Verwendung eines Proteins nach Anspruch 1 als Antigen zur Erzeugung von spezifischen Antikörpern.
10. Antikörper, die spezifisch das Protein nach Anspruch 1 erkennen.
- 5 11. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz zur Gentherapie.
12. Verwendung einer zu der Sequenz gemäß Anspruch 3 komplementären Nukleinsäuresequenz zur Gentherapie.
- <210> 3
<211> 26
<212> DNA.
<213> Homo sapiens
- 10 <400> 3
ctcgaaagc ggcgcattgt gtttgt
26
- 15 <210> 4
<211> 26
<212> DNA
<213> Homo sapiens
- 20 <400> 4
gagccacc agatgacacgc caactt
26
- 25 <210> 5
<211> 26
<212> DNA
<213> Homo sapiens
- 30 <400> 5
tgaaaggcac ggcacgacaa gaaacg
26
- 35
- Patentansprüche**
1. Isoliertes Protein, enthaltend die in SEQ ID NO:2 dargestellte Aminosäuresequenz oder eins daraus durch Substitution, Insertion oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäureresten erhaltenliche Sequenz, wobei wenigstens noch eine der wesentlichen biologischen Eigenschaften des in SEQ ID NO:2 dargestellten Proteins erhalten bleibt.
 2. Protein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um ein humanes Protein handelt.
 3. Nukleinsäuresequenz codierend für ein Protein nach Anspruch 1.
 4. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein Protein codiert, das wenigstens 40 60 % Identität mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Sequenz hat.
 5. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie die in SEQ ID NO:1 dargestellte Sequenz enthält.
 6. Rekombinantes Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 3 funktionell verknüpft mit mindestens einem genetischen Regulationselement.
 7. Wirtsorganismus, transformiert mit einer rekombinanten Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 6.
 8. Wirtsorganismus, transformiert mit einem rekombinanten Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 6.